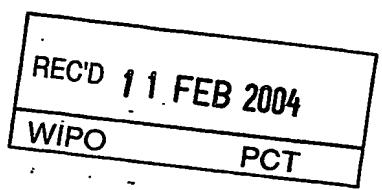


BUNDE~~RE~~REPUBLIK DEUTS~~RE~~LAND

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 103 06 084.7
Anmeldetag: 07. Februar 2003
Anmelder/Inhaber: Technische Universität Dresden,
01069 Dresden/DE
Bezeichnung: Gegen hTERT gerichtete Erkennungsmoleküle
und die Verwendung dieser
Priorität: 06.12.2002 DE 102 58 117.7
IPC: A 61 K 48/00

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 15. Januar 2004
Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

im Auftrag

Wallner

PRIORITY DOCUMENT
 SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
 COMPLIANCE WITH
 RULE 17.1(a) OR (b)

BEST AVAILABLE COPY

P174702DE1-La

7. Februar 2003

5

Gegen hTERT gerichtete Erkennungsmoleküle und die
Verwendung dieser

10

Beschreibung

15 Die vorliegende Erfindung betrifft Erkennungsmoleküle, die
gegen ein Gen einer katalytischen Untereinheit der humanen
Telomerase (hTERT) gerichtet sind sowie die Verwendung
dieser Erkennungsmoleküle zur Diagnose, Prophylaxe,
Behandlung, Verlaufskontrolle von mit Zellwachstum,
20 -differenzierung und/oder -teilung im Zusammenhang
stehenden Krankheiten, wie beispielsweise Tumor-
erkrankungen.

Es ist bekannt, dass die Replikation der Enden von
25 eukaryotischen Chromosomen spezialisierte Zellbestandteile
erfordert. Die Replikation eines linearen DNA-Stranges
erfolgt in der Regel in 5'-3'-Richtung. Durch die
Entfernung der zum äußereren 3'-Ende der chromosomal DNA
komplementären RNA-Primer, die für die Replikations-
30 initiation essentiell sind, bleiben bei jeder
Replikationsrunde die 5'-Enden neusynthetisierter DNA-
Stränge unvollständig. Dadurch kommt es zu einer
fortschreitenden Verkürzung der Tochterstränge bei jeder

Replikationsrunde (End-Replikationsproblem) [Levy et al.]. Diese Verkürzung an den als Telomere bezeichneten Chromosomenenden ist unter anderem für die Steuerung der Proliferationsfähigkeit und damit für die Alterung von 5 Zellen verantwortlich [Harley]. Die Struktur dieser Telomere ist in zahlreichen lebenden Systemen untersucht.

Das Ribonukleoenzym Telomerase besitzt in einer Vielzahl von Organismen die Aufgabe, die Telomere proliferierender Zellen zu verlängern und zu stabilisieren, womit das End-Replikationsproblem nivelliert wird [Greider et al.]. Diese reverse Transkriptase besteht aus zwei essentiellen Untereinheiten: einer RNA-Komponente (hTR) und einer katalytischen Untereinheit (hTERT) [Beattie et al.].

15

Übereinstimmend mit der Beziehung zwischen Telomeren und der Telomerase sowie der Proliferationsfähigkeit der Zellen wurde in immortalisierten Zelllinien sowie in >85% der untersuchten Tumoren eine Telomerase -aktivität 20 nachgewiesen [Kim et al.]. Diese korreliert mit der Expression der hTERT-Komponente, wie beim Harnblasenkarzinom gezeigt wurde [Ito et al.]. Weiterhin ist ein Zusammenhang zwischen dem hTERT-Expressionsniveau im Harnblasenkarzinom und dem klinischen Verlauf der 25 Tumorerkrankung bekannt (de Kok et al.). Daher ist die humane Telomerase ein ideales Ziel für die Diagnose und Behandlung menschlicher Krankheiten, die mit zellulärer Proliferation im Zusammenhang stehen, wie beispielsweise Krebs. Verfahren zur Diagnose und Behandlung von Krebs und 30 anderen mit der Telomerase assoziierten Krankheiten sind unter anderem offenbart in der US 5 489 508 oder US

5 645 986. Die Hemmung der Telomerase wurde als spezifische Möglichkeit zur therapeutischen Kontrolle von Tumorzellen beschrieben. Wichtige Bemühungen, die Aktivität der Telomerase im Zusammenhang von Krebserkrankungen zu 5 modifizieren, sind in der EP 666313, WO 97/37691 oder der WO 98/28442 offenbart. Derartige allgemeine Lehren offenbaren dem Fachmann aber keine konkreten Lehren zum technischen Handeln. Eine Substanz bzw. ein Molekül, das mit dem gesamten für hTERT kodierenden Sequenzbereich wechselwirkt, führt zwar dazu, dass die entsprechende Telomeraseaktivität - beispielsweise in einer Zellkultur - reduziert wird, derartige Substanzen eignen sich aber nicht zur Applikation in Organismen, da sie in der Regel viel zu groß sind und vom Immunsystem des betreffenden Organismus 10 angegriffen und zerstört werden. Darüber hinaus kann eine Vielzahl unerwünschter Wechselwirkungen bzw. Nebenwirkungen auftreten. Aufgabe der Erfindung war es daher, alternative kompakte Moleküle bereitzustellen, die mit ausgewählten, spezifischen Struktureinheiten, die die Telomerase 15 kodieren, einfach und effektiv inhibierend wechselwirken.

20

Die Erfindung löst dieses technische Problem durch die Bereitstellung eines Erkennungsmoleküls, das gegen eine mRNA der katalytischen Untereinheit der humanen Telomerase 25 (hTERT) gerichtet ist, wobei das Erkennungsmolekül insbesondere mit Primärstrukturen dieser hTERT-mRNA in einem Zielsequenzbereich von 2000 bis 2500 gemäß dem Gendatenbankeintrag AF 015950 spezifisch interagiert. Die Zahlen repräsentieren - auch in folgenden Anschnitten - die 30 entsprechenden Nukleotidpositionen innerhalb der hTERT-mRNA (Gesamtlänge 4015 Nukleotide). Die Erfindung betrifft also

die überraschende Lehre, dass gegen tumorassoziierte abnorme hTERT-mRNA-Expressionsmuster sowie Telomeraseaktivitätsniveaus durch eine mögliche hTERT-Inhibition mit den erfindungsgemäßen Erkennungsmolekülen vorgegangen werden kann. Diese Erkennungsmoleküle sind gegen definierte hTERT-mRNA-Sequenzmotive im Bereich von 2000 bis 2500 gerichtet. Sie können biologische und/oder chemische Strukturen sein, die in der Lage sind, so mit dem Zielsequenzbereich zu interagieren, dass eine spezifische Erkennung / Bindung und Wechselwirkung bestimmt werden kann. Beispiele für Erkennungsmoleküle können insbesondere Nukleinsäurekonstrukte, Antikörper bzw. andere zur Zielsequenz Affinität / Bindungsspezifität / Wechselwirkungsfähigkeit aufweisende Substanzen wie Affiline, Lektine, Aptamere oder andere Moleküle sein.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung interagiert das Erkennungsmolekül mit einem Zielsequenzbereich von 2100 bis 2400. Dieser Bereich ist vorteilhaft, um eine hTERT-Inhibition zu erreichen.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung interagiert das Erkennungsmolekül mit einem Zielsequenzbereich von 2190 bis 2360. In diesem Bereich ist mit Vorteil eine besonders gute hTERT-Inhibition erreichbar.

In einer ganz besonders bevorzugten Ausführungsform interagiert das Erkennungsmolekül spezifisch mit dem Zielsequenzbereich von 2191 bis 2224 und/oder von 2318 bis 2346. Vorteilhafterweise ist in diesen Sequenzbereichen eine besonders effiziente hTERT-Inhibition möglich.

Bevorzugt sind ebenfalls kürzere Bereiche mit Veränderungen innerhalb dieser Zielsequenzen oder mit veränderten Randbereichen oder unterschiedlichen Derivatisierungen/Modifizierungen/Fusionen/Komplexierungen, die auch mit 5 anderen Erkennungsmolekülen kombiniert und/oder gekoppelt sein können.

Durch diese bevorzugten Zielsequenzbereiche ist es dem 10 Fachmann möglich, insbesondere sehr kleine und/oder kompakte Erkennungsmoleküle bereitzustellen, die im Wesentlichen nicht mit anderen Strukturen, insbesondere immunologischen Abwehrstrukturen, innerhalb des Zellgewebes bzw. des Organismus interagieren oder von diesen 15 angegriffen werden, sondern spezifisch mit dem Zielsequenzbereich der hTERT-mRNA interagieren können.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist vorgesehen, dass der Sequenzbereich oder das 20 Erkennungsmolekül durch Addition, Amplifikation, Inversion, Missense-Mutation, Nonsense-Mutation, Punktmutation, Deletion und/oder Substitution modifiziert ist. Diese 25 Modifikationen können beispielsweise beim Erkennungsmolekül dazu führen, dass es mit einer höheren Avidität oder Spezifität an die mRNA der katalytischen hTERT-Untereinheit bindet. Es kann jedoch selbstverständlich auch vorgesehen 30 sein, dass das Erkennungsmolekül mit geringerer Spezifität oder Avidität bindet. Bei den Mutationen im hTERT-Sequenzbereich kann es sich im Sinne der Erfindung zum Beispiel um vererbbares oder nicht vererbbares Veränderungen handeln. Die Modifikationen können so beschaffen sein, dass sie direkt auf der mRNA-Ebene oder auf der DNA-Ebene

detektierbar werden. Zu den Mutationen können beispielsweise auch Mutationen im Zusammenhang mit einer zytologisch sichtbaren Genom- und/oder Chromosomenmutationen zählen, die mit Veränderungen der 5 hTERT assoziiert sind. Derartige Mutationen können dadurch entstehen, dass Teile des Chromosoms verloren gehen, verdoppelt werden, in umgekehrter Orientierung vorliegen oder auf andere Chromosomen übertragen werden. Selbstverständlich ist es auch möglich, dass die Mutation nur ein oder wenige benachbarte Basenpaare betrifft, wie dies beispielsweise bei der Punktmutation der Fall ist. Geht beispielsweise ein Basenpaar in Form einer Deletion verloren oder wird ein Basenpaar zusätzlich, wie bei der Insertion, eingeschoben, so verschiebt sich das Leseraster 10 des betroffenen Gens zu einer Leserastermutation. Bei der Substitutionsmutation im Sinne der Erfindung wird beispielsweise eine Base gegen eine andere ausgetauscht, wobei die daraus resultierenden Konsequenzen 15 unterschiedlich sein können:

20 (a) Es kann beispielsweise ein Kodon in ein synonymes Kodon umgewandelt werden,

25 (b) oder die Mutation verändert die Kodonspezifität und führt damit zum Einbau anderer Aminosäuren bzw.

(c) durch die Mutation wird die Translation an einer bestimmten Stelle beendet, wobei die gebildeten hTERT-Fragmente inaktiv oder aktiv sein können.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist das Erkennungsmolekül ein Nukleinsäurekonstrukt, ein Chelator, ein Lektin und/oder ein Antikörper. Nukleinsäurekonstrukte im Sinne der Erfindung können alle Strukturen sein, die im 5 Wesentlichen auf Nukleinsäuren basieren oder deren aktives Zentrum im Wesentlichen auf Nukleinsäuren basiert. Es kann selbstverständlich möglich sein, dass das gesamte Erkennungsmolekül vor allem aus Lipiden, Kohlenhydraten oder Proteinen bzw. Peptiden besteht - beispielsweise in Form einer Nanokapsel - und dieses Konstrukt einen Bereich 10 umfasst, der Nukleinsäuren enthält, die mit hTERT wechselwirken können. Dem Fachmann sind verschiedene Möglichkeiten bekannt, derartige Konstrukte bereitzustellen. Ein Chelator im Sinne der Erfindung ist 15 eine Sammelbezeichnung für zyklische Verbindungen, bei denen Metalle, Gruppierungen mit einsamen Elektronenpaaren oder mit Elektronenlücken und Wasserstoff an der Ringbildung beteiligt sind und die weiterhin in der Lage sind, mit der hTERT-mRNA spezifisch zu interagieren. Die 20 Koordinationsverbindungen der Metalle, die im Sinne der Erfindung als Metallchelatoren bezeichnet werden können, sind besonders vorteilhaft. Es sind Verbindungen, in denen ein einzelner Ligand mehr als eine Koordinationsstelle an einem Zentralatom besetzt, das heißt mindestens zweizellig 25 ist. In diesem Falle werden normalerweise gestreckte Verbindungen durch Komplexbildung über ein Metallatom oder -ion zu Ringen geschlossen, wobei diese Ringe in der Lage sind, spezifisch mit der hTERT-mRNA zu interagieren. Ein Lektin im Sinne der Erfindung ist insbesondere ein 30 Phytohämagglutinin, häufig ein Pflanzenprotein, das aufgrund seiner hohen Affinität zu bestimmten Komponenten

an der Oberfläche bestimmter Nukleinsäurestrukturen spezifisch binden und agglutinieren kann. Insbesondere wechselwirken Lektine mit Zuckerstrukturen, die mit spezifischen Sequenzbereichen einer Nukleinsäure assoziiert 5 sein können. Ein Antikörper im Sinne der Erfindung bindet die genannten hTERT-Zielbereiche spezifisch. Die Antikörper können auch modifizierte Antikörper sein (zum Beispiel oligomere, reduzierte, oxidierte und markierte Antikörper). Der in der vorliegenden Beschreibung verwendete Begriff 10 Antikörper umfasst sowohl intakte Moleküle als auch Antikörperfragmente, die bestimmte Determinanten des Zielbereiches binden. Bei diesen Fragmenten ist die Fähigkeit des Antikörpers zur selektiven Bindung teilweise erhalten geblieben, wobei die Fragmente wie folgt definiert 15 sind:

- (1) Fab, das Fragment, das ein monovalentes Antigenbindungsfragment eines Antikörper-Moleküls enthält, lässt sich mittels Spaltung eines ganzen Antikörpers mit dem Enzym Papain erzeugen, wobei eine intakte leichte Kette und ein Teil einer schweren Kette erhalten werden;
- (2) das Fab'-Fragment eines Antikörper-Moleküls lässt sich mittels Behandlung eines ganzen Antikörpers mit Pepsin und anschließender Reduktion gewinnen, wobei eine intakte leichte Kette und ein Teil der schweren Kette erhalten werden; pro Antikörper-Molekül werden zwei Fab'-Fragmente erhalten;
- (3) $F(ab')_2$, das Fragment des Antikörpers, das sich mittels Behandlung eines ganzen Antikörpers mit dem

Enzym Pepsin ohne anschließende Reduktion erhalten lässt; $F(ab')_2$ ist eine Dimer von zwei Fab' -Fragmenten, die durch zwei Disulfid-Bindungen zusammengehalten werden;

5 (4) Fv , definiert als gentechnisch verändertes Fragment, das den variablen Bereich der leichten Kette und den variablen Bereich der schweren Kette enthält und in Form von zwei Ketten exprimiert wird; und

10 (5) Einzelketten-Antikörper („SCA“), definiert als gentechnisch verändertes Molekül, das den variablen Bereich der leichten Kette und den variablen Bereich der schweren Kette enthält, die durch einen geeigneten Polypeptid-Linker zu einem fusionierten Einzelketten-Molekül verbunden sind.

15

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist das Nukleinsäurekonstrukt ein Antisense (AS)-Oligonukleotid (ON), ein DNAzym, ein Ribozym, eine siRNA und/oder eine Peptid-Nukleinsäure (PNA).

20 Bei AS-Konstrukten handelt es sich um synthetisch hergestellte Moleküle, die eine selektive Inhibition der Biosynthese ausgewählter Proteine ermöglichen. Zum Einsatz kommen zum Beispiel ON, PNAs, Ribozyme, DNAzyme. Die AS-Wirkung beruht auf der sequenzspezifischen Hybridisierung der Konstrukte durch Watson-Crick-Basenpaarung mit der für das zu reprimierende Protein kodierenden Ziel-mRNA, was über verschiedene Mechanismen zu einer Verhinderung der 25 Proteinsynthese führt (Tab.1).

30

Tab. 1 AS-Effekte und ihre Wirkungsmechanismen

ss - "single stranded" (Einzelstrang)

Effekt	Mechanismus	Referenzen
Transkriptions-inhibition	Bindung der AS-Konstrukte an genomische DNA durch Hoogsten-Triplex-Bildung	[Moser et al.]
Modulation der RNA-Prozessierung	a) Blockierung von Spleißstellen führt zur Verhinderung des Spleißvorgangs b) Verhinderung der Polyadenylierung destabilisiert die mRNA c) Behinderung des mRNA-Transports ins Zytoplasma	[Kole et al., Crooke]
Hemmung der Translation	kompetitive Bindung des AS-Konstrukts an die Ziel-mRNA verhindert Initiations- bzw. Elongationsprozess	[Boiziau et al.]
Spaltung der Ziel-mRNA	a) selektiver Abbau des RNA-Stranges in RNA-DNA-Hybriden durch die Endonuklease RNase H b) Abbau von ss-RNA durch die Endonuklease RNase L nach Aktivierung durch 2',5'-Tetraadenylat-modifizierte ON c) durch Ribozyme/DNAzyme katalysierte, sequenzspezifische Spaltung der Ziel-mRNA	[Crooke, Agrawal et al., Sun et al.]

Die Entwicklung von AS-ON als therapeutische Substanzen stellt neben verschiedenen anderen Anwendungsfeldern auch ein neues erfolgversprechendes Therapiekonzept für

onkologische Erkrankungen dar [Tamm et al.]. Während es bei der konventionellen Chemotherapie zu einer unspezifischen Hemmung der Zellproliferation kommt, werden mit der AS-Therapie ganz gezielt solche mRNAs inaktiviert, die die molekulare Grundlage oder einen wesentlichen Bestandteil des entarteten, deregulierten Wachstums und der Tumorprogression darstellen sowie für die Inhibierung der körpereigenen Immunabwehr verantwortlich sein können.

10 AS-ON unterscheiden sich von anderen Therapeutika, wie Antikörpern, Toxinen oder Immuntoxinen dahingehend, dass es sich um relativ kleine Moleküle mit einem Molekulargewicht von üblicherweise etwa 5 kDa handelt. Die geringe Größe der AS-ON ermöglicht eine gute Gewebe penetration. Außerdem ist

15 bekannt, dass Tumorblutgefäße im Gegensatz zu Blutgefäßen normaler Gewebe für Substanzen in einem Größenbereich zwischen 4-10 kDa durchlässig sind. Das bedeutet, dass therapeutische AS-ON gezielt Tumorblutgefäße penetrieren können. Ein weiterer Vorteil dieser Substanzen, zum 20 Beispiel gegenüber Antikörpern, die nahezu ausschließlich gegen extrazelluläre Proteine wirksam sind, besteht darin, dass über die jeweilige Ziel-mRNA prinzipiell alle, also sowohl zytoplasmatische als auch kernlokalierte sowie membranständige Proteine angegriffen werden können.

25 Die gegen einen Nuklease-Angriff relativ resistenten Phosphorthioat-AS-ON werden gegenwärtig in einer Reihe von klinischen Studien (Phase I-III) hinsichtlich ihres Potentials als Anti-Krebs-Therapeutika evaluiert. Dabei 30 werden in Tumoren überexprimierte Ziel-mRNA-Moleküle angegriffen.

Bei Verwendung der Phosphothioat-ON (PS-ON) wurde eine Reihe von unerwarteten, so genannten "non-AS"-Effekten beobachtet, die zudem zu einer unspezifischen Hemmung des Zellwachstums führen können. Diese Effekte sind stark von der ON-Sequenz bzw. von bestimmten Sequenzmotiven abhängig und treten auf Grund der starken polyanionischen Ladung der PS-ON auf, welche eine Bindung der PS-ON an lebenswichtige Proteine zur Folge haben kann. Die erwähnten negativen Effekte können insbesondere durch Verwendung von partiell phosphothioat-modifizierten AS-ON oder durch weitere Modifikationen, z.B. Einbau von Ribonukleotiden anstatt Desoxyribonukleotiden, überwunden werden. Eine partielle endständige Modifizierung von ON-Konstrukten (bevorzugt 2 bis 5 Bindungen vom 3'- und 5'-Nukleinsäureterminus sind modifiziert) bietet eine erhöhte Stabilität im extra- und intrazellulären Milieu der Zielzellen (Schutz vor Abbau durch Exonukleasen), insbesondere bei einer Applikation *in vivo*. Ein positiver Nebeneffekt, der bei Verwendung der PS-ON beobachtet wurde, ist deren immunstimulatorische Wirkung, die bei einigen Tumoranwendungen durchaus einen möglichen Therapieerfolg unterstützen kann.

Zur Erhöhung der Stabilität und Spezifität von AS-ON und zur Verminderung der "non-AS"-Effekte können weitere chemische Modifikationen zum Einsatz kommen, z.B. Einbau von 2'-O-Methylribonukleotiden, Methylphosphonat-Segmenten, "locked nucleic acids" (Methylenbrücke zwischen 2'-Sauerstoff und 4'-Kohlenstoff der Ribose), Austausch des Cytosins durch 5'-Methylcytosin und/oder eine 2'-5'-Tetraadenylat-Modifizierung.

Dabei kann es sich sowohl um partiell modifizierte oder vollständig via dieser chemischen Modifikation veränderte ON-Konstrukte handeln.

5

Ribozyme sind als katalytisch aktive RNA-Moleküle in der Lage, zelluläre RNA-Strukturen als Substrate zu erkennen und sequenzspezifisch an einer Phosphordiesterbindung zu spalten. Die Erkennung erfolgt über AS-Arme, die aufgrund komplementärer Sequenzen eine Hybridisierung mit der Ziel-mRNA ermöglichen. Gegenüber AS-ON besitzen Ribozyme den grundsätzlichen Vorteil, dass ein Ribozym-Molekül als echter Katalysator eine große Anzahl identischer Substratmoleküle umsetzen kann. Daher sind Ribozyme bereits in wesentlich geringerer Konzentration als ON wirksam und führen darüber hinaus durch die Substrat-Spaltung zu einem irreversiblen RNA-Abbau [Sun et al.].

10

15

20

25

30

Unter den bisher bekannten Ribozymtypen ist das Hammerhead-Ribozym (Review: Birikh et al., 1997; Tanner, 1999) für derartige Anwendungen besonders interessant, weil es als vergleichsweise kleines Molekül (ca. 30-50 Nukleotide) bereits katalytisch aktiv sein kann. Ein sehr wirksames trans-spaltendes Hammerhead-Ribozym besteht zum Beispiel aus lediglich 14 konservierten Nukleotiden in der katalytischen Domäne und zwei variablen Stammsequenzen (vorteilhaftweise aus jeweils 6-8 Nukleotiden), die durch Watson-Crick-Basenpaarung (analog der AS-ON) die sequenzspezifische Erkennung des zu spaltenden Substrates realisieren und dieses anschließend durch Spaltung einer Phosphordiester-Bindung inaktivieren. In dieser Form lässt

sich praktisch gegen jedes beliebige RNA-Molekül, welches eine potentielle Spaltstelle mit der minimalen Sequenzanforderung -NUX- besitzt, ein spezifisch spaltendes Hammerhead-Ribozym konstruieren und somit beispielsweise 5 zelluläre mRNA oder virale RNA inhibieren. Weitere katalytische Nukleinsäuren vom DNA-Typ (z.B. DNAzyme) sind analog einsetzbar.

RNAi ("RNA interference") ist eine neue Methodik, die eine spezifische Geninhibition von Zielmolekülen auf mRNA-Ebene ermöglicht. Hierfür müssen doppelsträngige RNA-Moleküle („small interference RNA“, siRNA) mit ihren zwei Nukleotiden langen 3'-Überhängen, bestehend bevorzugt aus Thymidin-Nukleotiden, in Zellen transfiziert werden. 15 Zunächst erfolgt eine Assoziation der siRNA-Konstrukte mit spezifischen zellulären Proteinen, gefolgt durch die Erkennung der Ziel-mRNA-Sequenz aufgrund der Komplementarität des AS-si-RNA-Stranges. Die intrinsische Endonukleaseaktivität des Ribonukleoproteinkomplexes 20 ermöglicht eine spezifische Degradation der zu inhibierenden mRNA.

In einer besonderen Ausführungsform der Erfindung ist das AS-ON ein PS-ON bzw. ein mit weiteren chemischen 25 Veränderungen modifiziertes Nukleinsäurekonstrukt.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist der Sequenzbereich der hTERT-mRNA, zu der das Erkennungsmolekül komplementär ist, ausgewählt aus der 30 Gruppe umfassend 2183-2205, 2206-2225, 2315-2334, 2317-2336, 2324-2346, 2331-2350 und/oder 2333-2352.

Mit diesen Sequenzbereichen ist es vorteilhafte Weise möglich, die hTERT-Expression zu inhibieren. Durch die Inhibition können unter anderem Krankheiten, die mit der 5 Expression dieses Gens assoziiert sind, unterdrückt werden, wie zum Beispiel Tumoren.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist das Erkennungsmolekül immobilisiert. Im Sinne der 10 Erfindung werden unter Immobilisierung verschiedene Verfahren und Techniken zum Fixieren der Erkennungsmoleküle auf bestimmten Trägern verstanden. Die Immobilisierung kann beispielsweise der Stabilisierung der Erkennungsmoleküle dienen, wodurch diese insbesondere bei Lagerung oder bei 15 einmaligem Batch-Ansatz durch biologische, chemische oder physikalische Einwirkungen in ihrer Aktivität nicht reduziert oder nachteilig modifiziert werden. Durch die Immobilisierung der Erkennungsmoleküle ist ein wiederholter Einsatz unter technischen oder klinischen 20 Routine-Bedingungen möglich; weiterhin kann die Probe mit den Erkennungsmolekülen kontinuierlich umgesetzt werden. Dies kann insbesondere durch verschiedene Immobilisierungstechniken erreicht werden, wobei die Bindung der Erkennungsmoleküle an andere Erkennungsmoleküle 25 oder Moleküle bzw. an einen Träger so erfolgt, dass die dreidimensionale Struktur am aktiven Zentrum der entsprechenden Moleküle, insbesondere der Erkennungsmoleküle, nicht verändert wird. Vorteilhafte Weise geht die Spezifität zu hTERT und die 30 Spezifität der eigentlichen Bindungsreaktion durch die Immobilisierung nicht verloren. Im Sinne der Erfindung

können drei grundsätzliche Methoden zur Immobilisierung verwendet werden:

(i) Quervernetzung: Bei der Quervernetzung werden die Erkennungsmoleküle miteinander fixiert, ohne dass ihre Aktivität nachteilig beeinflusst wird. Sie sind vorteilhafterweise durch die Quervernetzung nicht mehr löslich.

(ii) Bindung an einen Träger: Die Bindung an einen Träger erfolgt zum Beispiel durch Adsorption, Ionenbindung oder kovalente Bindung. Dies kann auch innerhalb von mikrobiellen Zellen bzw. Liposomen oder anderen membranhaltigen geschlossenen bzw. offenen Strukturen erfolgen. Das Erkennungsmolekül wird durch die Fixierung vorteilhafterweise nicht in seiner Aktivität beeinflusst. Es kann mit Vorteil zum Beispiel in der Klinik in Diagnose oder Therapieträger gebunden mehrfach oder kontinuierlich eingesetzt werden.

(iii) Einschluss: Der Einschluss erfolgt im Sinne der Erfindung insbesondere in eine semipermeable Membran in Form von Gelen, Fibrillen oder Fasern. Gekapselte Erkennungsmoleküle sind durch eine semipermeable Membran so durch die umgebende Probenlösung getrennt, dass sie vorteilhafterweise noch mit der katalytischen Untereinheit der humanen Telomerase oder mit Fragmenten dieser interagieren können.

Für die Immobilisierung stehen verschiedene Verfahren zur Verfügung, wie beispielsweise die Adsorption an einen

inerten oder elektrisch geladenen anorganischen oder organischen Träger. Solche Träger können beispielsweise poröse Gele, Aluminiumoxid, Betonid, Agarose, Stärke, Nylon oder Polyacrylamid sein. Die Immobilisierung erfolgt 5 hierbei durch physikalische Bindungskräfte, oft unter Beteiligung von hydrophoben Wechselwirkungen und ionischen Bindungen. Derartige Methoden sind vorteilhafterweise einfach zu handhaben und sie beeinflussen die Konformation der Erkennungsmoleküle nur in geringem Umfang. Durch 10 elektrostatische Bindungskräfte zwischen den geladenen Gruppen der Erkennungsmoleküle und dem Träger kann die Bindung vorteilhafterweise verbessert werden, zum Beispiel durch die Verwendung von Ionenaustauschern, wie zum Beispiel Sephadex. Ein weiteres Verfahren ist die kovalente 15 Bindung an Trägermaterialien. Die Träger können dazu reaktive Gruppen aufweisen, die mit Aminosäure-Seitenketten homöopolare Bindungen eingehen. Geeignete Gruppen in Erkennungsmolekülen sind Carboxy-, Hydroxy- und Sulfidgruppen und insbesondere die endständigen 20 Aminogruppen von Lysinen. Aromatische Gruppen bieten die Möglichkeit für Diazo-Kupplungen. Die Oberfläche von mikroskopischen porösen Glaspartikeln kann durch Behandlung mit Silanen aktiviert und anschließend mit Erkennungsmolekülen besetzt werden. Hydroxy-Gruppen 25 natürlicher Polymere können zum Beispiel mit Bromzyan aktiviert und anschließend mit Erkennungsmolekülen gekoppelt werden. Mit Polyacrylamid-Harzen können zahlreiche Erkennungsmoleküle vorteilhafterweise direkte kovalente Bindungen eingehen. Bei dem Einschluss in 30 dreidimensionale Netzwerke werden die Erkennungsmoleküle in ionotrophe Gele oder andere dem Fachmann bekannte

Strukturen eingeschlossen. Die Poren der Matrix sind insbesondere so beschaffen, dass die Erkennungsmoleküle zurückgehalten werden und eine Interaktion mit den Ziel-Molekülen möglich ist. Bei der Quervernetzung werden die 5 Erkennungsmoleküle durch Vernetzung mit bifunktionellen Agenzien in polymere Aggregate umgewandelt. Derartige Strukturen sind gelatinös und leicht verformbar und insbesondere für den Einsatz in verschiedenen Reaktoren geeignet. Durch Zugabe anderer inaktiver Komponenten, wie 10 zum Beispiel Gelatine, bei der Vernetzung können die mechanischen und enzymatischen Eigenschaften vorteilhafterweise verbessert werden. Bei der Mikroverkapselung wird der Reaktionsraum der Erkennungsmoleküle mit Hilfe von Membranen eingegrenzt. Die 15 Mikroverkapselung kann zum Beispiel als Grenzflächen-Polymerisation durchgeführt werden. Durch die Immobilisierung bei der Mikroverkapselung werden die Erkennungsmoleküle unlöslich und dadurch wiederverwendbar. Im Sinne der Erfindung sind immobilisierte 20 Erkennungsmoleküle alle Erkennungsmoleküle, die sich in einem Zustand befinden, der ihre Wiederverwendung erlaubt. Die Einschränkung der Beweglichkeit und der Löslichkeit der Erkennungsmoleküle auf chemischem, biologischem oder physikalischem Wege führt vorteilhafterweise zu niedrigen 25 Verfahrenskosten.

Die Erfindung betrifft auch eine pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend die erfindungsgemäßen Erkennungsmoleküle, gegebenenfalls in einer Kombination mit 30 einem pharmazeutisch verträglichen Träger. Dieser pharmazeutische Träger kann insbesondere zusätzliche Stoffe

und Substanzen, wie beispielsweise medizinische und/oder pharmazeutisch-technische Hilfsstoffe, umfassen. Medizinische Hilfsstoffe sind beispielsweise solche Stoffe, die zur Produktion als Ingredienzien von pharmazeutischen 5 Zusammensetzungen eingesetzt werden. Pharmazeutisch-technische Hilfsstoffe dienen der geeigneten Formulierung der pharmazeutischen Zusammensetzung oder des Arzneimittels und können sogar - sofern sie nur während des Herstellungsverfahrens benötigt werden - anschließend entfernt werden oder können als pharmazeutisch verträgliche Trägersubstanzen Teil der pharmazeutischen Zusammensetzung sein. Die pharmazeutische Zusammensetzung erfolgt gegebenenfalls in Kombination mit einem pharmazeutisch verträglichen Verdünnungsmittel. Hierbei kann es sich 15 beispielsweise um phosphatgepufferte Kochsalzlösung, Wasser, Emulsionen, wie beispielsweise Öl/Wasser-Emulsionen, verschiedene Arten von Detergenzien, sterile Lösungen und ähnliches handeln. Die Verabreichung der pharmazeutischen Zusammensetzung kann beispielsweise im 20 Zusammenhang mit einer Gentherapie geschehen.

Im Sinne der Erfindung ist eine Gentherapie eine Behandlungsform unter Einsatz von natürlichen oder rekombinant veränderten Nukleinsäure-Konstrukten, einzelner 25 Gensequenzen oder ganzer Gen- bzw. Chromosomenabschnitte bzw. kodierter Transkriptbereiche, deren Derivate/Modifizierungen mit dem Ziel einer biologisch-basierten und selektiven Hemmung bzw. Revertierung der Krankheitssymptome und/oder deren kausalen Ursachen, wobei im speziellen Fall 30 darunter die Inhibition eines im Verlauf einer Krankheit

überexprimierten Zielmoleküls auf Ebene der Nukleinsäuren, insbesondere auf der Transkriptebene, verstanden wird.

Die Gentherapie kann beispielsweise auch über geeignete 5 Vektoren, wie beispielsweise virale Vektoren oder/und eine Komplexierung mit Lipiden oder Dendrimeren erfolgen. Die Gentherapie kann insbesondere auch über die Verpackung in Proteinhüllen erfolgen. Weiterhin ist es möglich, dass das Erkennungsmolekül mit einem weiteren Molekül fusioniert oder komplexiert ist, welches den gerichteten Transport zum Zielort, die Aufnahme in und/oder die Verteilung innerhalb der Zielzelle unterstützt. Die Art der Dosierung und des Verabreichungsweges kann vom behandelnden Arzt entsprechend den klinischen Anforderungen bestimmt werden. Es ist dem 10 Fachmann bekannt, dass die Art der Dosierung von verschiedenen Faktoren abhängig ist, wie beispielsweise der Größe, der Körperoberfläche, dem Alter, dem Geschlecht oder dem allgemeinen und krankheitsspezifischen Gesundheitszustand des Patienten, aber auch von dem speziellen Mittel, 15 welches verabreicht wird, der Dauer und Art der Verabreichung und von anderen Medikamenten, die möglicherweise parallel, insbesondere in einer Kombinationstherapie, verabreicht werden.

20 25 Die Erfindung betrifft auch einen Kit umfassend das Erkennungsmolekül und/oder die pharmazeutische Zusammensetzung. Weiterhin betrifft die Erfindung auch ein Array umfassend das Erkennungsmolekül und/oder die pharmazeutische Zusammensetzung. Der Kit und der Array können zur Diagnose und/oder Therapie von Krankheiten 30 eingesetzt werden, die mit der Funktion der katalytischen

Untereinheit der humanen Telomerase assoziiert sind. Die Erfindung betrifft auch die Verwendung des Erkennungsmoleküls, des Kits, des Arrays zur Diagnose, Prophylaxe, Verminderung, Therapie, Verlaufskontrolle 5 und/oder Nachbehandlung von mit Zellwachstum, -differenzierung und/oder -teilung im Zusammenhang stehenden Krankheiten.

10 In einer bevorzugten Ausführungsform ist die mit Zellwachstum, -differenzierung und/oder -teilung im Zusammenhang stehende Krankheit ein Tumor. Besonders bevorzugt ist der Tumor ein solider Tumor und/oder ein Blut- oder Lymphdrüsenträger.

15 Insbesondere kann es sich bei den Tumoren, die epithelialen oder mesodermalen Ursprungs sein können, im Sinne der Erfindung um gut- oder bösartige Krebsarten der Organe der Lunge, der Prostata, der Harnblase, der Niere, der Speiseröhre, des Magens, der Bauchspeicheldrüse (Pankreas), 20 des Hirns, des Ovars, des Skelettsystems handeln, wobei besonders das Adenokarzinom der Brust, der Prostata, der Lunge und des Darms, Knochenmarkkrebs, das Melanom, das Hepatom, die Kopf-Hals-Tumoren explizit als Vertreter bösartiger (so genannte maligne) Tumoren bevorzugt sind.

25 Zur Gruppe der Blut- und Lymphdrüsenträgerarten werden im Sinne der Erfindung alle Formen von Leukämien (z.B. in Zusammenhang mit B-Zellen-Leukämie, Gemischt-Zellen-Leukämie, Nullzellen-Leukämie, T-Zellen-Leukämie, chronische T-Zellen-Leukämie, HTLV-II-assozierte Leukämie, 30 akute lymphatische Leukämie, chronisch-lymphatische Leukämie, Mastzell-Leukämie und myeloische Leukämie) und

Lymphomen gezählt. Beispiele von mesenchymalen bösartigen Tumoren (sogenannte Knochen- und Weichteilsarkome) sind: Fibrosarkom; das maligne Histiozytom; das Liposarkom; Hämangiosarkom; das Chondrosarkom und das Osteosarkom;

5 Fibrosarkom; das Leio- und Rhabdomyosarkom, das Synovialsarkom; Karzinosarkom,. Als weitere Tumorarten, die im Sinne der Erfindung auch unter dem Begriff „Neoplasmen“ zusammengefasst werden, sind bevorzugt: Knochen-Neoplasmen, Brust-Neoplasmen, Neoplasmen des Verdauungssystems, 10 colorektale Neoplasmen, Leber-Neoplasmen, Pankreas-Neoplasmen, Hirnanhang-Neoplasmen, Hoden-Neoplasmen, Orbita-Neoplasmen, Neoplasmen des Kopfes und Halses, des Zentralnervensystems, Neoplasmen des Hörorgans, des Beckens, des Atmungstrakts und des Urogenitaltrakts).

15 In einer weiter bevorzugten Ausführungsform ist die Krebserkrankung oder der Tumor, die/der behandelt oder verhindert wird, ausgewählt aus der Gruppe: Tumoren des Hals-Nasen-Ohren-Bereichs umfassend Tumoren der inneren Nase, der Nasennebenhöhlen, des Nasopharynx, der Lippen, 20 der Mundhöhle, des Oropharynx, des Larynx, des Hypopharynx, des Ohres, der Speicheldrüsen und Paragangliome, Tumoren der Lunge umfassend nicht-kleinzellige Bronchialkarzinome, kleinzellige Bronchialkarzinome, Tumoren des Mediastinums,

25 Tumoren des Gastrointestinaltraktes umfassend Tumoren des Ösophagus, des Magens, des Pankreas, der Leber, der Gallenblase und der Gallenwege, des Dünndarms, Kolon- und Rektumkarzinome und Analkarzinome, Urogenitaltumoren umfassend Tumoren der Nieren, der Harnleiter, der Blase, 30 der Prostata, der Harnröhre, des Penis und der Hoden, gynäkologische Tumoren umfassend Tumoren der Zervix, der

Vagina, der Vulva, Korpuskarzinom, maligne Trophoblastenerkrankung, Ovarialkarzinom, Tumoren des Eileiters (Tuba Falloppii), Tumoren der Bauchhöhle, Mammakarzinome, Tumoren endokriner Organe umfassend Tumoren der Schilddrüse, der Nebenschilddrüse, der Nebennierenrinde, endokrine Pankreastumoren, Karzinoidtumoren und Karzinoidsyndrom, multiple endokrine Neoplasien, Knochen- und Weichteilsarkome, Mesotheliome, Hauttumoren, Melanome umfassend kutane und intraokulare Melanome, Tumoren des zentralen Nervensystems, Tumoren im Kindesalter umfassend Retinoblastom, Wilms Tumor, Neurofibromatose, Neuroblastom, Ewing-Sarkom-Tumorfamilie, Rhabdomyosarkom, Lymphome umfassend Non-Hodgkin-Lymphome, kutane T-Zell-Lymphome, primäre Lymphome des zentralen Nervensystems, Morbus Hodgkin, Leukämien umfassend akute Leukämien, chronische myeloische und lymphatische Leukämien, Plasmazell-Neoplasmen, myelodysplastische Syndrome, paraneoplastische Syndrome, Metastasen ohne bekannten Primärtumor (CUP-Syndrom), peritoneale Karzinomastose, Immunsuppression-bedingte Malignität umfassend AIDS-bezogene Malignitäten wie Kaposi-Sarkom, AIDS-assoziierte Lymphome, AIDS-assoziierte Lymphome des zentralen Nervensystems, AIDS-assoziierten Morbus Hodgkin und AIDS-assoziierte anogenitale Tumoren, Transplantationsbedingte Malignitäten, metastasierte Tumoren umfassend Gehirnmetastasen, Lungenmetastasen, Lebermetastasen, Knochenmetastasen, pleurale und perikardiale Metastasen und maligne Aszites.

In einer besonderen Ausführungsform der Erfindung handelt es sich bei dem soliden Tumor um einen Tumor des Urogenitaltraktes und/oder des Gastrointestinaltraktes.

5 In einer weiteren besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist vorgesehen, dass der Tumor ein Kolonkarzinom, ein Magenkarzinom, ein Pankreaskarzinom, ein Dickdarmkrebs, ein Dünndarmkrebs, ein Ovarialkarzinom, ein Zervikalkarzinom, ein Lungenkrebs, ein Nierenzellkarzinom, ein Hirntumor, ein Kopf-Halstumor, ein Leberkarzinom und/oder eine Metastase dieser Tumoren/Karzinome ist.

10 In einer weiteren besonders bevorzugten Ausführungsform ist der solide Tumor ein Mamma-, Bronchial-, Kolorektal-
15 und/oder Prostatakarzinom.

20 In einer ganz besonders bevorzugten Ausführungsform ist der Tumor des Urogenitaltraktes ein Harnblasenkarzinom (BCa). Das BCa stellt in der Bundesrepublik Deutschland die vierthäufigste Krebsform und siebthäufigste Krebstodesursache bei Männern dar. Die TUR-B als generelle Primärtherapie des BCa erlaubt eine organerhaltende Entfernung von oberflächlichen Tumoren. Trotz dieser histopathologisch definierten vollständigen Entfernung des
25 Tumors ist mit 50-70 % der Patienten ein relativ hoher Anteil innerhalb von zwei Jahren von einem Rezidiv betroffen [Stein et al.]. Ein Diagnose- sowie Therapieproblem stellt das synchrone oder metachrone multifokale Auftreten von Tumorherden dar, wodurch das
30 Auftreten von Rezidiven entfernt von der resezierten Primärtumorlokalisation bedingt sein kann [Sidransky et

al.). Bei Auftreten eines Rezidivs oder bei primär als oberflächlich eingestuften Tumoren erfolgt in der Regel nach der TUR-B eine Langzeitprophylaxe mit einem Immun- (Bazillus Calmette-Guérin - BCG) oder Chemotherapeutikum

5 (z. B. Mitomycin-C, Taxol, Gemcitabin/Cisplatin). Patienten mit muskelinvasiven BCa und mit entdifferenzierten, oberflächlichen Tumoren, die trotz dieser Therapie rezidivieren, werden in der Regel radikal zystektomiert bzw. unter Erhalt der Blase mittels Mono-/Polychemo-, 10 Immun- oder Strahlentherapie bzw. Kombinationsverfahren dieser Methoden behandelt. Chemo-, Immun- oder Strahlenbehandlungen sind aufgrund ihrer relativ unspezifischen Wirkmechanismen von einer hohen therapieinduzierten Toxizität begleitet.

15 Aufgrund der gesundheitspolitischen Bedeutung des BCa (insbesondere in den westlichen Industrieländern), dem Fehlen tumorspezifischer Marker sowie der bekannten tumorbiologischen und zellulären Heterogenität des Tumors 20 gibt es eine intensive Suche auf dem klinischen Forschungsgebiet zum BCa, die insbesondere auf die Identifizierung neuer oder/und ergänzender Therapieoptionen zielen.

25 In einer besonderen Ausführungsform der Erfindung werden das Erkennungsmolekül, die pharmazeutische Zusammensetzung, der Kit und/oder der Array für eine Verlaufskontrolle verwendet, die im Wesentlichen eine Überwachung der Wirksamkeit einer Antitumorbehandlung darstellt. Weiterhin 30 ist es bevorzugt, dass das Erkennungsmolekül in einer Kombinationstherapie, insbesondere zur Behandlung von

Tumoren, verwendet wird. Besonders bevorzugt ist hierbei, dass die Kombinationstherapie eine Chemotherapie, eine Zytostatikabehandlung und/oder eine Strahlentherapie umfasst. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der 5 Erfindung ist die Kombinationstherapie eine adjuvante biologisch-spezifizierte Therapieform. Ganz besonders bevorzugt ist hierbei, dass diese Therapieform eine Immuntherapie ist. Weiterhin ist besonders bevorzugt, dass die Kombinationstherapie eine Gentherapie und/oder eine 10 Therapie mit einem Erkennungsmolekül gegen dasselbe oder ein anderes Zielmolekül umfasst. Dem Fachmann sind verschiedene Kombinationstherapien, insbesondere zur Behandlung von Tumoren, bekannt. Es kann zum Beispiel vorgesehen sein, dass innerhalb einer Kombinationstherapie 15 eine Zytostatikabehandlung erfolgt oder beispielsweise eine Bestrahlung eines bestimmten Tumorareals, wobei diese Behandlung mit einer Gentherapie kombiniert wird, wobei das erfindungsgemäße Erkennungsmolekül als Antikrebsmittel eingesetzt wird. Das erfindungsgemäße Erkennungsmolekül 20 kann jedoch auch in Kombination mit anderen Erkennungsmolekülen eingesetzt werden. Demgemäß kann es ganz besonders bevorzugt sein, dass das Erkennungsmolekül zur Erhöhung der Sensitivität von Tumorzellen gegenüber Zytostatika und/oder Strahlen verwendet wird. Weiterhin ist 25 es bevorzugt, dass das Erkennungsmolekül zur Hemmung der Vitalität, der Proliferationsrate von Zellen und/oder zur Induktion von Apoptose und eines Zellzyklus-Arrests verwendet wird.

Im Folgenden soll die Erfindung anhand eines Beispiels näher erläutert werden, ohne auf dieses Beispiel beschränkt zu sein.

5 Beispiel

Die gut transfizierbare humane Harnblasenkarzinom-Zelllinie EJ28 zeigte nach Transfektion insbesondere bei Verwendung von fünf spezifischen anti-hTERT-AS-Konstrukten (vgl. Tab.

10 2) eine unmittelbar einsetzende und kontinuierliche Reduktion ihrer Viabilität um mehr als 65 % gegenüber der Nonsense (NS)-Kontrolle (vgl. Abb. 2). Dabei war die Beobachtung besonders auffällig, dass vier der wirksamsten Konstrukte gegen ein einzelnes mRNA-Sequenzmotiv gerichtet 15 waren.

Bereits nach vier von fünf Behandlungen mit dem Konstrukt ASTel2331-50 waren nahezu keine lebenden Zellen mehr im Kulturgefäß nachweisbar. Die Behandlung telomerasennegativer

20 humaner Fibroblasten führte hingegen zu keinen signifikanten Unterschieden zwischen AS- und NS-ON-behandelten Zellen, was eine Spezifität der AS-O-N-Wirkung auf die BCa-Zelllinie EJ28 indirekt belegt (Daten nicht gezeigt). Die AS-spezifische Wirksamkeit wurde anschließend

25 detailliert untersucht: in Übereinstimmung mit dem Viabilitätstest konnte in Bezug auf das Proliferations- und Zellkoloniebildungsverhalten (Abb. 4) ein Hemmeffekt dieser fünf AS-ON belegt werden. Zudem konnte die AS-spezifische Verringerung des Zellanteils in der DNA-Synthesephase (bis 30 ca. 30 %) in Richtung einer G1-Arretierung nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Der Beweis für die AS-

spezifische Wirkung der gegen die Zielmotive gerichteten AS-ON wurde in Form einer signifikanten und zeitabhängigen Reduktion der hTERT-Transkriptmenge erbracht (Abb. 3). In Übereinstimmung damit wurde auch die hTERT-
5 Proteinexpression reprimiert. Außerdem wurde als Folge davon die Telomeraseaktivität der EJ28-Zellen um mehr als 60 % gehemmt (Daten nicht gezeigt).

Tab. 2 hTERT-AS- und NS-ON: Nukleotid- und Zielsequenzen

10

Bezeichnung ¹	ss-Motiv ²	Sequenz ³ (5' → 3')
AS-ON		
ASel2206-2225	2191-2224	tgtcctggggatggtgtcg
ASel2315-2334		tt gaaggccttgcggacgtg
ASel2317-2336		tcttgaaggccttgcggacg
ASel2331-2350	2318-2346	ggtagagacgtggct tt ga
ASel2333-2352		aaggtagagacgtggcttt
NS-ON		
NS-K2		cagtctcagtactgaagctg
NS-K3		cagttcagtactgagactg

¹ Der Name beinhaltet den Sequenzbereich der hTERT-mRNA (Acc. No.: AF015950), zu der das jeweilige AS-ON komplementär ist; ² Die dargestellten Motive enthalten am 5'- und 3'-Terminus jeweils 10 nt doppelsträngige RNA;

15 ³ Die fett gedruckten Nukleotide stellen den Bereich im AS-ON dar, der komplementär zur ss-Region des Zielmotivs ist.

P174702DE-La

29. Januar 2003

5

Patentansprüche

10

1. Erkennungsmolekül gerichtet gegen ein Gen einer katalytischen Untereinheit der humanen Telomerase, dadurch gekennzeichnet, dass das Erkennungsmolekül mit der mRNA der katalytischen Untereinheit der humanen Telomerase in einem Zielsequenzbereich von 2000 bis 15 2500 gemäß der Accession number AF015950 spezifisch interagiert.
2. Erkennungsmolekül nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Erkennungsmolekül mit dem Zielsequenzbereich von 2100 bis 2400 spezifisch interagiert.
3. Erkennungsmolekül nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass das Erkennungsmolekül mit dem Zielsequenzbereich von 2190 bis 2360 spezifisch interagiert.
4. Erkennungsmolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass das Erkennungsmolekül mit dem Zielsequenzbereich von 2191 bis 2224 und/oder von 30 2318 bis 2346 spezifisch interagiert.

5. Erkennungsmolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass der Sequenzbereich und/oder das Erkennungsmolekül durch Addition, 5 Amplifikation, Inversion, Missense-Mutation, Nonsense-Mutation, Punktmutation, Deletion und/oder Substitution modifiziert ist.
- 10 6. Erkennungsmolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass das Erkennungsmolekül immobilisiert ist.
- 15 7. Erkennungsmolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass das Erkennungsmolekül ein Nukleinsäurekonstrukt, ein Chelator, ein Lektin und/oder ein Antikörper ist.
- 20 8. Erkennungsmolekül nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass es mit einem weiteren Molekül fusioniert oder komplexiert ist, welches den gerichteten Transport zum Zielort, die Aufnahme in und/oder die Verteilung innerhalb der Zielzelle unterstützt.
- 25 9. Erkennungsmolekül nach Anspruch 7 oder 8, dadurch gekennzeichnet, dass das Nukleinsäurekonstrukt ein Antisense-Oligonukleotid, ein DNAzym, eine Peptid-Nukleinsäure, ein Ribozym und/oder eine siRNA ist.

10. Erkennungsmolekül nach Anspruch 9,
dadurch gekennzeichnet, dass das Antisense-
Oligonukleotid durch Phosphothioatbindungen und/oder
5 andere chemische Modifikationen verändert ist.
11. Erkennungsmolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 10,
dadurch gekennzeichnet, dass der Sequenzbereich der
hTERT-mRNA, zu der das Erkennungsmolekül komplementär
10 ist, aus der Gruppe umfassend 2183-2205, 2206-2225,
2315-2334, 2317-2336, 2324-2346, , 2331-2350 und/oder
2333-2352 ausgewählt ist.
12. Pharmazeutische Zusammensetzung umfassend ein
15 Erkennungsmolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 11,
gegebenenfalls in Kombination mit einem pharmazeutisch
verträglichen Träger.
13. Kit umfassend ein Erkennungsmolekül nach einem der
20 Ansprüche 1 bis 11 und/oder eine pharmazeutische
Zusammensetzung nach Anspruch 12.
14. Array umfassend ein Erkennungsmolekül nach einem der
Ansprüche 1 bis 11 und/oder eine pharmazeutische
25 Zusammensetzung nach Anspruch 12.
15. Verwendung eines Erkennungsmoleküls nach einem der
Ansprüche 1 bis 11, eines Kits nach Anspruch 13
und/oder eines Arrays nach Anspruch 14 zur Diagnose,
30 Prophylaxe, Therapie, Verlaufskontrolle und/oder
Nachbehandlung von mit Zellwachstum, -differenzierung

und/oder -teilung im Zusammenhang stehenden Krankheiten.

16. Verwendung nach dem vorhergehenden Anspruch,
5 dadurch gekennzeichnet, dass die Krankheit ein Tumor ist.
17. Verwendung nach dem vorhergehenden Anspruch,
10 dadurch gekennzeichnet, dass der Tumor ein solider Tumor oder eine Leukämie ist.
18. Verwendung nach dem vorhergehenden Anspruch,
15 dadurch gekennzeichnet, dass der solide Tumor ein Tumor des Urogenitaltraktes und/oder des Gastrointestinaltraktes ist.
19. Verwendung nach Anspruch 16,
20 dadurch gekennzeichnet, dass der Tumor ein Kolonkarzinom, ein Magenkarzinom, ein Pankreas-
karzinom, ein Dünndarmkrebs, ein Ovarialkarzinom, ein Zervikalkarzinom, ein Lungenkrebs, ein Nierenzellkarzinom, ein Hirntumor, ein Kopf-Halstumor, ein Leberkarzinom und/oder eine Metastase dieser Tumoren ist.
- 25 20. Verwendung nach Anspruch 16,
dadurch gekennzeichnet, dass der solide Tumor ein Mamma-, Bronchial-, Kolorektal- und/oder Prostata-
karzinom und/oder eine Metastase dieser Tumoren ist.

21. Verwendung nach Anspruch 18,
dadurch gekennzeichnet, dass der Tumor des
Urogenitaltraktes ein Harnblasenkarzinom und/oder eine
Metastase dieser Tumoren ist.

5

22. Verwendung nach Anspruch 15,
dadurch gekennzeichnet, dass die Verlaufskontrolle eine
Überwachung der Wirksamkeit einer Antitumorbehandlung
ist.

10

23. Verwendung nach einem der Ansprüche 15 bis 22,
dadurch gekennzeichnet, dass das Erkennungsmolekül in
einer Kombinationstherapie verwendet wird.

15 24. Verwendung nach dem vorhergehenden Anspruch,
dadurch gekennzeichnet, dass die Kombinationstherapie
eine Chemotherapie, eine Zytostatikabehandlung und/
oder eine Strahlentherapie umfasst.

20 25. Verwendung nach dem vorhergehenden Anspruch,
dadurch gekennzeichnet, dass die Kombinationstherapie
eine adjuvante biologisch-spezifizierte Therapieform
umfasst.

25 26. Verwendung nach dem vorhergehenden Anspruch,
dadurch gekennzeichnet, dass die Therapieform eine
Immuntherapie ist.

27. Verwendung nach einem Anspruch 23 bis 26,
30 dadurch gekennzeichnet, dass die Kombinationstherapie
eine Gentherapie und/oder eine Therapie mit einem

Erkennungsmolekül desselben oder eines anderen Zielmoleküls umfasst.

28. Verwendung nach einem der Ansprüche 15 bis 24 zur Erhöhung der Sensitivität von Tumorzellen gegenüber Zytostatika und/oder Strahlen.
5
29. Verwendungsmolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 11 zur Hemmung der Vitalität, der Proliferationsrate von Zellen zur Induktion von Apoptose und/oder eines Zellzyklus-Arrests.
10

Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft Erkennungsmoleküle, die
5 gegen ein Gen einer katalytischen Untereinheit der humanen
Telomerase gerichtet sind sowie die Verwendung dieser
Erkennungsmoleküle zur Diagnose, Prophylaxe, Verminderung,
Verlaufskontrolle von mit Zellwachstum, -differenzierung
und/oder -teilung im Zusammenhang stehenden Krankheiten,
10 wie beispielsweise Tumorerkrankungen.

Literaturverzeichnis

5 Agrawal S, Zhao Q: Antisense therapeutics. *Curr Opin Chem Biol* (1998) 2: 519-28.

10 Beattie TL, Zhou W, Robinson MO, Harrington L: Reconstitution of human telomerase activity in vitro. *Curr Biol* (1998) 8: 177-80.

15 Boiziau C, Kurfurst R, Cazenave C, Roig V, Thuong NT, Toulme JJ: Inhibition of translation initiation by antisense oligonucleotides via an RNase-H independent mechanism. *Nucleic Acids Res* (1991) 19: 1113-9.

20 Crooke ST: Molecular mechanisms of action of antisense drugs. *Biochim Biophys Acta* (1999) 1489: 31-44.

25 Greider CW, Blackburn EH: Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts. *Cell* (1985) 43: 405-13.

30 Harley CB: Telomere loss: mitotic clock or genetic time bomb? *Mutat Res* (1991) 256: 271-82.

35 Ito H, Kyo S, Kanaya T, Takakura M, Inoue M, Namiki M: Expression of human telomerase subunits and correlation with telomerase activity in urothelial cancer. *Clin Cancer Res* (1998) 4: 1603-8.

Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, Coviello GM, Wright WE, Weinrich SL, Shay JW: Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* (1994) 266: 2011-5.

De Kok JB, Schalken JA, Aalders TW, Ruers TJ, Willems HL, Swinkels DW: Quantitative measurement of telomerase reverse transcriptase (hTERT) mRNA in urothelial cell carcinomas. *Int J Cancer* (2000) 87: 217-20.

5

Kole R, Sazani P: Antisense effects in the cell nucleus: modification of splicing. *Curr Opin Mol Ther* (2001) 3: 229-34.

10

Levy MZ, Allsopp RC, Futcher AB, Greider CW, Harley CB: Telomere end-replication problem and cell aging. *J Mol Biol* (1992) 225: 951-60.

15

Moser HE, Dervan PB: Sequence-specific cleavage of double helical DNA by triple helix formation. *Science* (1987) 238: 645-50.

20

Stein JP, Grossfeld GD, Ginsberg DA, Esrig D, Freeman JA, Figueroa AJ, Skinner DG, Cote RJ: Prognostic markers in bladder cancer: a contemporary review of the literature. *J Urol* (1998) 160: 645-59.

25

Sun LQ, Cairns MJ, Saravolac EG, Baker A, Gerlach WL: Catalytic nucleic acids: from lab to applications. *Pharmacol Rev* (2000) 52: 325-47.

Tamm I, Dorken B, Hartmann G: Antisense therapy in oncology: new hope for an old idea? *Lancet* (2001) 358: 489-97.

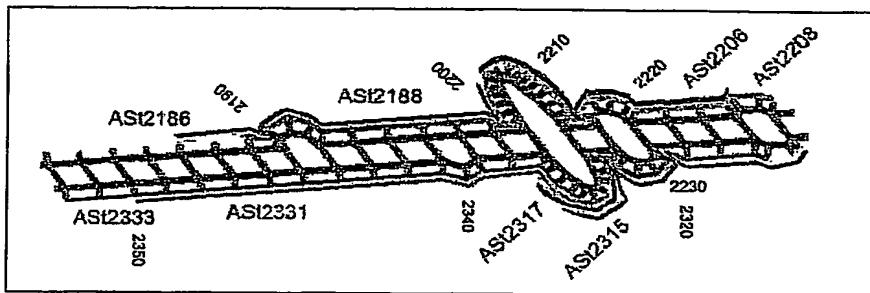
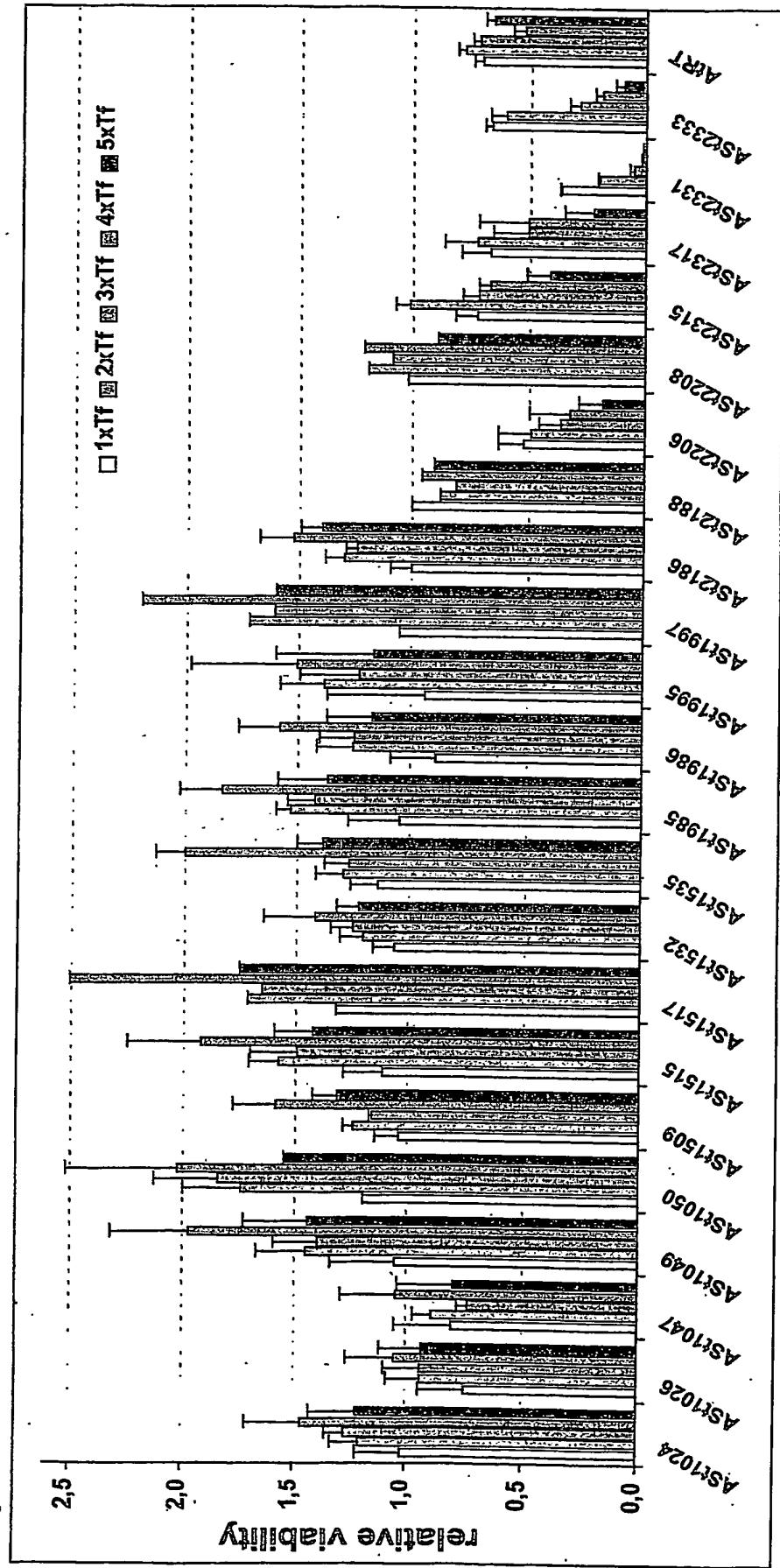


Abb. 1

AS-ODN gegen lokale Sekundärstrukturen der hTERT-mRNA

Dargestellt sind zwei gegenüberliegende ss-Strukturen (2201-14 und 2328-36 nt), gegen die jeweils vier AS-ODN gerichtet sind.



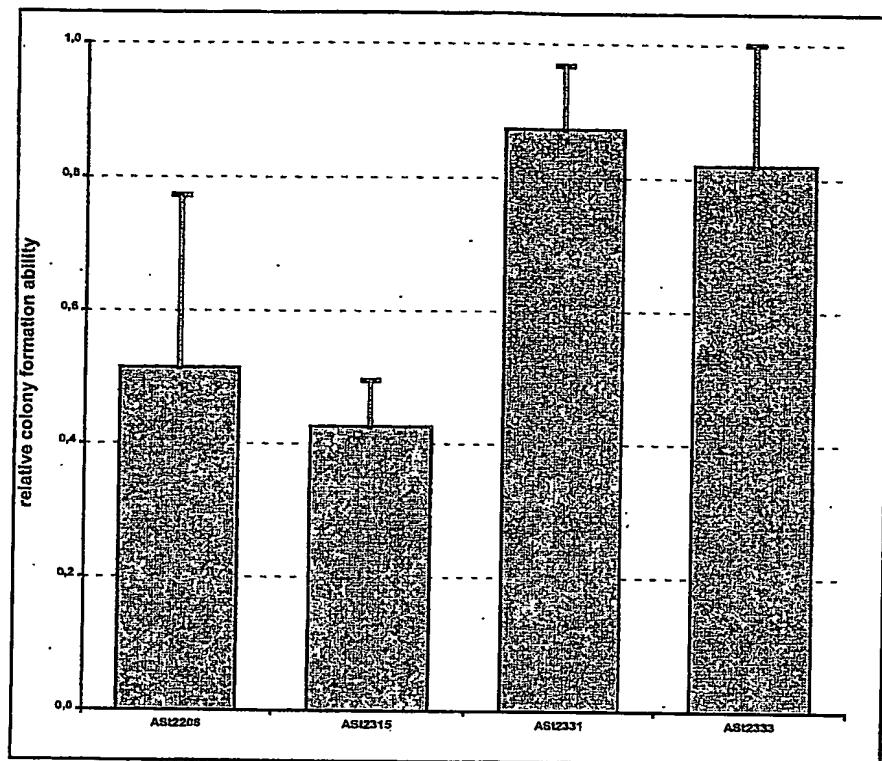


Abb. 3

Auswirkungen von zwei AS-ODN-Transfektionen auf das Kloniebildungsverhalten von EJ28-Zellen

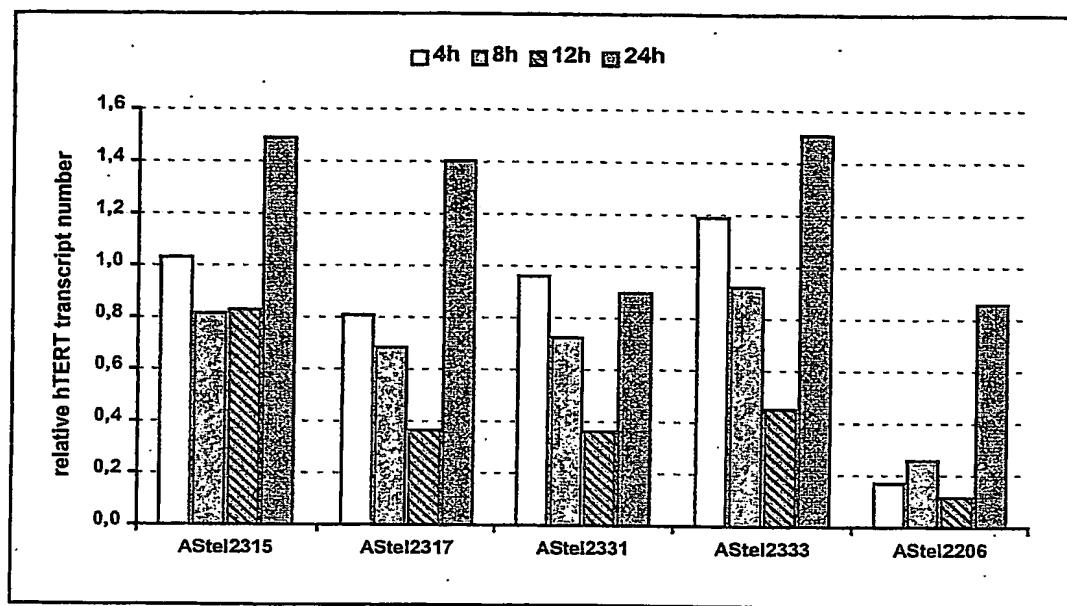


Abb. 4

Relatives Expressionsniveau AS-ODN behandelter EJ28-Zellen

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.